NARA THIERS CACCIATORI GALLETI BERNARDES

Desenvolvimento PCR em Tempo-Real em sistema TaqMan® para detecção de rotavírus em amostras clínicas de bovinos

São Paulo
2016

NARA THIERS CACCIATORI GALLETI BERNARDES

Desenvolvimento PCR em Tempo-Real em sistema TaqMan® para detecção de rotavírus em amostras clínicas de bovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 14/07/2016 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

VPS

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fabio Gregori

De acordo:_____

Orientador

São Paulo
2016

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3305
FMVZ

Bernardes, Nara Thiers Cacciatori Galleti
Desenvolvimento PCR em Tempo-Real em sistema TaqMan® para detecção de rotavírus em amostras clínicas de bovinos / Nara Thiers Cacciatori Galleti Bernardes. – 2016.
53 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Gregori.

1. PCR em Tempo Real. 2. Rotavírus. 3. Diagnóstico. 4. Diarreias. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento PCR em Tempo-Real em sistema TaqMan® para detecção de rotavírus em amostras clínicas de suínos, bovinos e efluentes de criações", protocolado sob o nº 2241/2011, utilizando amostras fecais de 200 (duzentos) bovinos e suínos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Fabio Gregori, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Development of a Real-time TaqMan® PCR for rotavirus detection in porcine and bovine clinical samples and wastewater", protocol number 2241/2011, utilizing fecal samples of 200 (two hundred) cattle and pigs, under the responsibility Prof. Dr. Fabio Gregori, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BERNARDES, Nara Thiers Cacciatori Galleti

Título: Desenvolvimento PCR em Tempo-Real em sistema TaqMan® para detecção de rotavírus em amostras clínicas de bovinos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data:____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Aos meus pais, meu irmão, meu marido e filho. Sem vocês não teria a força e a coragem de perpetuar esse caminho.

Agradecimentos

Á minha grande amiga **Laila** que esteve ao meu lado em todos os momentos, sempre deixando os problemas mais leves. Pra sempre chum!!!

À **Sheila** que aos poucos nos aproximamos e que sempre se mostrou uma grande amiga e sempre muito solicita.

À **Sueli** por toda paciência e muito ensinamento. Obrigada sempre!

Às amigas **Juliana**, **Giselle** e **Bruna** que tornaram mais felizes nossos dias no departamento.

À todos os amigos do **VPS** que direta ou indiretamente cooperaram para a realização desse projeto.

Ao Professor **Fabio Gregori** por toda paciência, sabedoria e orientação nesse trabalho.

A **CNPQ** pela concessão de bolsa para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

RESUMO

BERNARDES, N. T. C. G. **Desenvolvimento PCR em Tempo-Real em sistema Taqman® para detecção de rotavírus em amostras clínicas de bovinos.** (Development PCR Real-Time Taqman® system for rotavirus detection in clinical samples of cattle). 2016. 53 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A diarréia neonatal é o principal problema sanitário que acomete os bezerros nas primeiras semanas de vida, causando grandes prejuízos devido à morbidade, mortalidade, custos com tratamento e atraso no desenvolvimento. Os rotavírus são os mais importantes agentes virais causadores de gastroenterites em crianças e diarreia em diferentes espécies animais. Além do seu impacto econômico na produção animal, os bovinos podem atuar como reservatórios da diversidade genética e antigênica para humanos. Assim, o diagnóstico deste agente é fundamental para o desenvolvimento de medidas profiláticas mais especificas visando o seu controle. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de PCR em Tempo Real para a detecção de rotavírus bovinos em sistema Taqman® tendo como alvo, a proteína não-estrutural 5 (NSP5). Para isso, 113 amostras de fezes bovinas foram coletadas de reabanhos do estado de São Paulo, e previamente testadas por PCR convencional.Para a padronização da PCR em Tempo Real , a estirpe padrão foi clonada, gerando um plasmídeo com $3x10^{10}$ cópias/reação. Como controle exógeno foi utilizado β-actina. O limite de detecção foi determinado por diluições seriadas na base 10, detectando até $6x10^{1}$ cópias/µl. A curva padrão da PCR em Temo Real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5 teve como resultados, uma eficiência de 100,47%; com *slope* igual a -3,18 e R^2 de 1,0. De um total de 113 amostras testadas pela PCR convencional 63 delas (55,7%) foram consideradas positivas para rotavírus. Dessas mesmas amostras testadas, 5 não amplificaram para β-actina e não foram incluídas nas análises posteriores. Para a PCR em Tempo Real o limite de detecção foi considerado o valor de $6x10^{1}$ cópias/reação, sendo definido o ponto de corte o ciclo (Ct) de número 36 para o teste com a amostra viral a partir do DNA ligado em vetor plasmidial. Considerando-se o ponto de corte de 60 ($6x10^{1}$) cópias/reação, das 108 amostras testadas, 63 (58,3%) foram consideradas positivas ao teste. O valor de concordância obtido através do teste Kappa, a um intervalo de confiança de 95%, a partir dos resultados gerados entre os testes de PCR convencional e PCR em foi de 0.279 (baixa concordância). Os resultados obtidos nesse estudo demonstrou que o teste foi eficiente

podendo ser utilizado para um diagnóstico rápido e eficiente do rotavirus do grupo A, aumentando assim o repertório dos testes já estabelecidos.

Palavras-chave: PCR em Tempo Real. Rotavírus. Diagnóstico. Diarreias.

ABSTRACT

BERNARDES, N. T. C. G. **Development PCR Real-Time Taqman® system for rotavirus detection in clinical samples of cattle. (**Desenvolvimento PCR em Tempo-Real em sistema Taqman® para detecção de rotavírus em amostras clínicas de bovinos). 2016. 53 f. Tese [Doutorado em Ciências] – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Neonatal diarrhea is the main health problem affecting the calves in the first weeks of life, causing major losses due to morbidity, mortality, treatment costs and delayed development. Rotaviruses are the most important causative agents of viral gastroenteritis in children and in different animal species. In addition to its economic impact on livestock, cattle can act as reservoirs for genetic and antigenic diversity for human samples. Therefore, the diagnosis of this agent is critical to the development of more specific preventive measures for their control. The objective of this work is to develop a method of PCR for rotavirus detection in cattle using TaqMan® system targeting the 5 nonstructural protein (NSP5). For this, 113 samples of cattle feces were collected from farms of São Paulo, and previously tested by convencional PCR. To PCR standardization, the standard sample was cloned, generating plasmid $3x10^{10}$ copies/reaction. The β-actin was usede as exogenous control. The limit of detection was determined by serial dilutions, to detect 6 $x10^{1}$ copies/µl. The standard curve of PCR to encoding segment detection NSP5 protein had as a result, an efficiency of 108.5%; with slope equal to -3.18 and R^2 equal 1.. From a total of 113 samples tested by conventional PCR 63 (55.7%) were positive for rotavirus. From these samples 5 not amplifyed for β-actin gene and were not included in subsequent analyzes. For detection limit of Real-Time PCR was considered the amount of $6x10^{1}$ copies / reaction, the cut-off being defined cycle (Ct) number 36 to the test with a viral sample from the DNA ligated into plasmid vector. Considering the cut-off 60 ($6x10^{1}$) copies/reaction of the 108 samples tested, 63 (58.3%) were positive to the test. The correlation value obtained by the Kappa test, at a 95% confidence interval, based on results generated between the conventional and PCR testing PCR was 0.279 (low agreement). The results of this study demonstrated that the probe can be efficiently used for a fast and efficient diagnosis of rotavirus of group A, thereby enhancing the repertoire of the established tests.

Keywords: Real-Time PCR. Rotavirus. Diagnosis. Diarrhoea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação de uma sonda TaqMan anelando especificamente na sequência complementar situada entre as regiões de anelamento dos *primers*.....20

Figura 2- Alinhamento do fragmento parcial do gene codificador da proteína não estrutural NSP5 de rotavírus do sorogrupo A recuperados do GenBank.....26

Figura 3 - Representação esquemática da região flanqueadora da inserção do *amplicon* de 312 pb e 504 pb dos subtipos B e A no vetor plasmidial pTZ57R/T, respectivamente.....30

Figura 4- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR visando a amplificação de um fragmento do gene NSP5 de rotavirus.....34

Figura 5 - Curvas de amplificação das diluições de amostra viral, a partir do DNA ligado em vetor plasmidial, da reação de PCR em Tempo Real.....35

Figura 6 - Curva padrão da PCR em para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5.....35

Figura 7. Curvas de amplificação da reação de PCR em Tempo Real para a detecção do segmento codificador da β-actina.....36

Figura 8. Curvas de amplificação da reação de PCR em para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resultados comparativos entre as reações de PCR em Tempo Real e PCR convencional visando o diagnóstico de rotavírus bovino do grupo A 38

Tabela 2. Coeficiente de variação intra e inter-teste.....38

Tabela 3. Valores de concordância obtidos pelo teste Kappa, a um intervalo de confiança de 95%, a partir dos resultados gerados entre os testes de PCR convencional e PCR em Tempo Real 39

Lista de Quadros

Quadro 1- *Primers*, sequências, posição no genoma, comprimento do produto do par de *primers* visando a amplificação parcial do gene codificador da proteína não estrutural NSP5 desenhados durante o estudo.....27

Quadro 2 - Fluoróforos (*Reporter* e *quencher*), sequência e posição no genoma da sonda visando a emissão de fluorescência para permitir a detecção de um produto específico da PCR.....27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADRV-N = New Aldult Diarrhea Rotavirus

BLAST/n = Basic Local Alignment Search Tool

Ca^{++} = íons cálcio

Cl^{-} = íons cloro

DEPC = dietil-pirocarbonato

DLP = double-layered particle

dNTP = deoxinucleosídeo-trifosfato

dsRNA = RNA de fita dupla

EDTA = ácido etilenoamino tetra-acético

et al. = e colaboradores

g = aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s2)

kDA = quiloDalton

M = Molar

mL = mililitro

mM = milimolar

mRNA = RNA mensageiro

NCDV = Nebraska calf diarrhea vírus

ng = nanograma

nt = nucleotídeo

NSP = proteína não estrutural

NTPase = proteína nucleosídeo trifosfatase

ORF = open reading frame

PIB = Produto Interno Bruto

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

pb = pares de bases

pH = potencial hidrogeniônico

PCR = reação em cadeia pela polimerase

p/v = proporção peso e volume

RNA = ácido ribonucleico

RT-PCR = reação em cadeia pela polimerase precedida por transcrição reversa

RTPase = RNA triofosfatase

ssRNA = RNA de fita simples

Tm = temperatura de Melting

TRIS = hidroximetil-aminometano

VP = proteína estrutural

μg = micrograma

μL = microlitro

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**.....	**13**
2	**REVISÃO DE LITERATURA**.....	**15**
3	**OBJETIVOS**.....	**22**
4	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	**23**
4.1	AMOSTRAS CLÍNICAS.....	**23**
4.2	PREPARO DE AMOSTRAS FECAIS.....	**23**
4.3	AMOSTRA PADRÃO.....	**23**
4.4	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	**24**
4.5	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT).....	**24**
4.6	TRIAGEM DAS AMOSTRAS POR PCR CONVENCIONAL.....	**24**
4.7	PCR EM TEMPO REAL.....	**25**
4.7.1	***Primers* e sonda**.....	**25**
4.7.2	**Controle exógeno**.....	**27**
4.7.3	**Teste dos *primers* desenhados pela PCR convencional**.....	**28**
4.7.4	**Padronização da PCR em Tempo Real**.....	**28**
4.7.5	**Quantificação absoluta**.....	**29**
4.7.5.1	Inserção no plasmídeo, transofrmação bacteriana e extração plasmidial.....	**29**
4.7.5.2	Sequanciamento de DNA.....	**30**
4.7.5.3	Edição de sequencias de DNA.....	**30**
4.7.5.4	Quantificação do plasmídeo.....	**31**
4.7.5.5	Construção da curva	**31**
4.7.5.6	Teste das amostras.....	**32**
4.8	CÁLCULO DA CONCORDÂNCIA ENTRE PCR CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL.....	**32**
5	**RESULTADOS**.....	**33**
5.1	TRIAGEM DAS AMOSTRAS POR PCR CONVENCIONAL.....	**33**
5.2	PCR EM TEMPO REAL.....	**33**
5.2.1	**Teste do *primer* desenhados para reação de PCR em Tempo Real**.....	**33**
5.3	PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL.....	**33**
5.4	QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA.....	**34**
5.5	REPRODUTIBILIDADE.....	**38**
5.6	CÁLCULO DE CONCORDÂNCIA.....	**38**
6	**DISCUSSÃO**	**40**
7	**CONCLUSÃO**.....	**44**
	REFERÊCIAS.....	**45**
	ANEXO.....	**51**

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura está entre os principais destaques no agronegócio brasileiro, com expressiva participação na economia do país, tendo o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. Com um quinto da carne comercializada internacionalmente, assumiu a liderança nas exportações e vendas em mais de 180 países. Esse segmento divide-se em cadeias produtivas da carne e leite, tornando-o bastante lucrativo, a produção é estimada em R$ 67 bilhões. A importância econômica e social da bovinocultura em nosso país, é evidenciada pela presença da atividade em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2009).

Contribuindo para esse resultado, o clima tropical e a extensão territorial do Brasil permitem a criação da maioria do gado em pastagens. Além disso, o investimento em tecnologia e capacitação profissional, o desenvolvimento de políticas públicas, que permitem que o animal seja rastreado do seu nascimento até o abate; o controle da sanidade animal e segurança alimentar contribuíram para que o País atendesse às exigências dos mercados rigorosos e conquistasse espaço no cenário mundial (BRASIL, 2009).

Dentre as enfermidades que podem causar prejuízos a produção pecuária, a diarreia neonatal é de grande importância e merece atenção, pois as consequências econômicas são grandes, de impactos negativos, em termos de custos nos tratamentos veterinários e na redução de ganho de peso dos animais afetados, ou até mesmo morte.

Os mais importantes agentes causadores de gastroenterites, tanto em crianças como em outros animais de espécies variadas, são os Rotavírus, transmitidos através da via fecal-oral, onde a água e fômites são fundamentais para a transmissão sua veiculação (DEWEY, et al., 2003; ESTES; KAPIKIAN, 2007;). A ocorrência de gastroenterite em crianças, sobretudo em países subdesenvolvidos está relacionada aos rotavírus, acumulando mais de 610.000 mortes por ano (PARASHAR et al., 2006). Cabe ressaltar o seu caráter zoonótico ou mesmo a capacidade de infecção interespécies (PAHO, 2001; COOK et al., 2004; MARTELLA et al., 2005). Os bovinos atuam como reservatórios para a diversidade genética e antigênica dos rotavírus humano (MARTELLA et al. 2005; COOK et al. 2004, PAHO, 2001).

O agente vem sendo descrito na bovinocultura mundial, bem como no Brasil, por diversos autores (BRITO et al., 2000; GREGORI et al., 2000; BRANDÃO et al., 2002; STEYER et al., 2008), como causador de prejuízos ao produtor, em função da morte e refugo

dos animais, perda de uniformidade dos lotes, maior predisposição às demais infecções (principalmente respiratórias) e custos por tratamento de suporte (PAHO, 2001).

Os desenvolvimentos de testes diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos, permitem uma vigilância mais abrangente dos rotavírus circulantes nas diferentes espécies animais, dentre elas os bovinos, sendo um ponto chave na compreensão da patogenia, epidemiologia e prevenção da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A participação de rotavírus em quadros de diarreia, foi descrito pela primeira vez em 1969 por Mebus et al. (1969), através da inoculação experimental de um filtrado (livre de bactérias) oriundo de material fecal de animais com sintomas de diarreias em bezerros. Neste estudo, as partículas virais foram identificadas pelos autores por meio de microscopia eletrônica (ME), as quais foram denominadas com NCDV ("*Nebraska Calf Diahrea Virus*").

Em 1973, Bishop et al também identificaram por ME os mesmos agentes em biopsias do epitélio duodenal de crianças com gastrointerites de natureza não bacteriana. Flewet et al. (1974) verificaram que as partículas virais presentes no material fecal de bezerros com quadros de diarreia, bem como de crianças com gastroenterite aguda, eram morfologicamente indistinguíveis à ME.

E então, no ano de 1978, o ICTV (*International Comitee on Taxonomy of Viruses*) propuseram a criação do gênero *Rotavirus* como pertencente à família *Reoviridae* (MATTHEWS, 1979).

Os rotavírus são vírus não envelopados de RNA de fita dupla, pertencentes à família *Reoviridae*, Subfamília *Sedoreovirinae*, de simetria icosaédrica, com aspecto de roda radiada, de aproximadamente 75 nm de diâmetro, cujo genoma encontra-se envolto por uma tripla camada proteica e constitui-se de 11 segmentos de fita dupla, os quais codificam seis proteínas estruturais, denominadas VP (do inglês "viral protein" – VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e seis não estruturais, NSP ("non-structural proteins"- NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6) (FAUQUET, 2005).

A camada mais interna ("core") do vírus é constituída pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, a camada intermediária pela VP6, e a mais externa, composta pela VP4 e VP7. (FAUQUET, 2005; ESTES; KAPIKIAN, 2007). Com base na proteína viral VP6, que possui especificidade antigênica e é altamente imunogênica, é possível fazer a classificação dos rotavírus em oito grupos (A a H) (MATTHINJNSSENS , 2012), onde todos os membros de cada sorogrupo, independente da espécie de origem, apresentam seu próprio antígeno comum que é antigenicamente distinto dos demais entre os sorogrupos. Sendo os rotavírus do sorogrupo A os mais prevalentes na maioria dos surtos em diferentes espécies animais (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Em 2015, um estudo liderado por Mihalov-Kovács et al.(2015), sugere um provável novo grupo detectados em cães, o Rotavirus I, mas ainda não foi reconhecido pelo ICTV.

A patogenicidade e a atenuação das estirpes de rotavirus sorogrupo “A” são influenciadas diretamente pela VP4 que, juntamente com a VP7, estão associados à neutralização sorotipoespecífica e à proteção contra a infecção. A clivagem enzimática que ocorre na VP4 torna o vírus infeccioso. Essa enzima ocorre no lúmen intestinal, resultando na formação de duas novas proteínas: VP5 e VP8, as quais irão interagir com receptores dos enterócitos aumentando a infectividade do vírus. Estas proteínas estão assim, independentemente envolvidas com a indução de anticorpos neutralizantes e seus respectivos genes codificadores são marcadores para a caracterização das amostras em genotipos P e G (ALFIERI et al., 2007).

Recentemente, um sistema de uniformização de classificação e nomenclatura, baseado nas sequências de nucleotídeos – além de VP4 e VP7- foi proposto para a classificação dos rotavírus do grupo A. Este sistema atribui um genótipo para cada um dos 11 segmentos do genoma do vírus de forma que os genes VP7 - VP4 - VP6 – VP1 – VP2 – VP3 – NSP1 – NSP2- NSP3 - NSP4 – NSP5/6 são, descritos usando abreviações G*x* – P[*x*] – I*x* – R*x* – C*x* – M*x* – A*x* – N*x* – T*x* – E*x* – H*x*, respectivamente, onde “*x*” representa um número arábico (MATTHIJNSSENS et al., 2008).

Foram relatados até o momento pelo menos 27 diferentes genotipos G e 37 genotipos P, sendo os mais comuns em suínos o G3, G4, G5, G6 e G10 associados com P[6] ou P[7] (PARRA et al., 2008; GREGORI et al., 2009; MATTHIJNSSENS et al., 2011), muito embora já tenham sido descritos outros tipos e combinações. Enquanto que nos bovinos, há maior prevalência dos genotipos G6, G8, G10 associados ao P[1], P[5] e P[11] (ALFIERI et al., 2007; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Dentre as proteínas não estruturais, a NSP1 apresenta diversas características, tais como a extrema diversidade de sequência, uma região rica em cisteína altamente conservada, a atividade de ligação ao RNA, a acumulação no citoesqueleto e segregação não aleatória no rearranjo (BERN, 1992). A NSP2 é uma NTPase localizada nos viroplasmas, envolvida na virulência e na montagem do capsídeo (BINES; IVANOFF, 2002). A NSP3 é responsável por iniciar a tradução agindo na inibição da tradução do mRNAs celulares (MONTERO; ARIAS; LOPEZ, 2006). A NSP4 é a única que não se liga ao RNA, estando envolvida com a morfogênese viral servindo como um receptor intracelular para a ligação de intracelular para a ligação de subpartículas virais de dupla camada ao retículo endoplasmático na região carboxi-terminal (BALL et al., 1991; LOPEZ et al., 2005; RAINSFORD; McCRAE, 2007).

De acordo com Campagna et al. (2007), a NSP5 dos rotavírus é codificada pelo segmento 11 do genoma viral, contendo 667 pb, composta por 196-198 aminoácidos

(dependendo da amostra) com uma alta proporção de serina (21%) e treonina (4,5%), formando uma estrutura dimérica. Ela interage com a NSP2 e a polimerase viral VP1 e sofre alterações pós-translacionais que incluem O-glicosilação e um complexo padrão de hiperfosforilação, muito embora nesta última o seu significado biológico no ciclo replicativo dos rotavírus ainda seja objeto de estudo (CAMPAGNA; BURRONE, 2006; SEN et al., 2006). A inibição da NSP5 mediante RNA de interferência resulta na formação de viroplasmas defeituosos, reduzida síntese viral e decréscimo nos títulos de rotavírus (SEN et al., 2007).

O segmento 11 também contém a sequência codificadora da NSP6, numa segunda ORF (região aberta de leitura), cuja função ainda é pouco conhecida, mas que preliminarmente interage com a NSP5 nos processos de dimerização e hiperfosforilação. Porém, dado os baixos níveis de expressão da NSP6, sugere-se que ela não tenha um papel regulatório essencial (SAMANIEGO-HERNÁNDEZ et al., 2006).

Como a proteína NSP5 é sensível à fosforilação para o desempenho das suas atividades biológicas (SOTELO et al., 2010), a NSP2 ajuda a manter a homeostase de fosfatos no viroplasma, bem como induzir mudanças conformacionais nos dímeros de NSP5 de modo a expor os seus alvos para a atividade quinase celular (BAR-MAGEN et al., 2007).

Considerando este papel fundamental na replicação, a NSP5 apresenta uma elevada conservação (ESTES; KAPIKIAN, 2007), o que acaba por favorecer o desenvolvimento de métodos diagnósticos que tenham como alvo este gene.

A replicação genômica dos rotavírus ocorre logo após a entrada do vírus na célula, aproximadamente dentro de 2 a 3 horas após a infecção. A morfogênese de novas partículas se inicia numa estrutura citoplasmática específica de “montagem” denominada viroplasma, contendo quatro proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP6) e duas não estruturais (NSP2, NSP5) (ARNOLDI et al., 2007; EICHWALD et al., 2004).

Os estágios iniciais da replicação envolvem a adsorção viral mediada pela proteína VP4, e por seus produtos de clivagem, aos receptores celulares e entrada na célula. Dentre os receptores celulares envolvidos estão alguns gangliosídeos além de alguns tipos de integrinas e “*heat shock protein*” como co-receptores. Embora seu papel nos estágios iniciais de infecção viral ainda não esteja elucidado completamente, já foi demonstrado que a VP7 interage com a superfície celular logo após a ligação das espículas aos receptores (ESTES, 1996; KINH et al., 2012).

O ciclo replicativo ocorre integralmente no citoplasma celular, independente de estruturas celulares. Os primeiros transcritos de RNA viral, que funcionam como mRNA e

também de molde para a síntese de dsRNA constituinte da progênie viral, são sintetizados através da modulação da proteína VP1 (KAPIKIAN, 2001).

Algumas características destes vírus favorecem sua variabilidade, entre elas, um grande número de partículas excretadas quando em infecção (KOOPMANS; DUIZER, 2004), uma relativa resistência do vírus às condições ambientais e uma diversidade de hospedeiros, tendo ainda a possibilidade de infecções simultâneas de diferentes genotipos infectando um mesmo indivíduo (BRANTLY, 1995; BOK et al., 2001; JAIN et al., 2001; GOUVEA). Dentre os mecanismos de diversidade genética dos rotavírus estão envolvidas as mutações pontuais ("drifts"), reestruturações ("shifts" - "reassortants"), rearranjos ("rearrangements") (TANIGUCHI; URASAWA, 1995) e recombinações intragênicas (PARRA et al., 2004).

A infecção por rotavírus reduz a capacidade de absorção do intestino delgado devido a destruição dos enterócitos além de dificultar reabsorção de água, conduzindo assim a perda de fluidos e eletrólitos (CHO et al., 2010).

Para o diagnóstico das rotaviroses dispõe-se de diversas técnicas, e dentre as mais comumente empregadas estão a microscopia eletrônica (ME), eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação em cadeia pela polimerase precedida de transcriptase reversa (RT-PCR) (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Como qualquer técnica diagnóstica, cada uma delas apresentam vantagens e limitações. Por exemplo, a microscopia eletrônica implica na disponibilidade do equipamento e de pessoal treinado para este fim. A PAGE por sua vez, permite a detecção de rotavírus dos diferentes grupos, mas é de execução relativamente complexa especialmente no processamento de grande número de amostras, além de necessitar de uma elevada carga viral para a visualização das bandas, o que pode dificultar a detecção após a fase de elevada eliminação do vírus nas fezes (JEREZ, 1997). Já a reação de ELISA tem apresentado uma maior sensibilidade de detecção se comparada à PAGE, maior praticidade, porém depende do desenvolvimento de anticorpos específicos de restrita disponibilidade (GREGORI et al., 2000).

As reações convencionais de PCR contornaram várias destas limitações, permitindo, por exemplo, não só o diagnóstico, mas a sua caracterização genética de amostras circulantes (GOUVEA et al., 1994). Entretanto, ainda requerem a necessidade de infraestrutura laboratorial, o tempo para o processamento de amostras e o risco de contaminação do ambiente por DNA amplificado.

Nesse contexto, a reação de PCR em Tempo Real vem ganhando espaço, representando um grande avanço no diagnóstico de enfermidades em função da sua maior

acurácia, sensibilidade e especificidade, menor limiar de detecção, facilidade e velocidade no processamento das amostras, possibilidade de quantificação da carga viral, menor exposição a substâncias cancerígenas e minimização de contaminação cruzada devido ao sistema fechado de tubos (MACKAY et al., 2002; PANG et al., 2004).

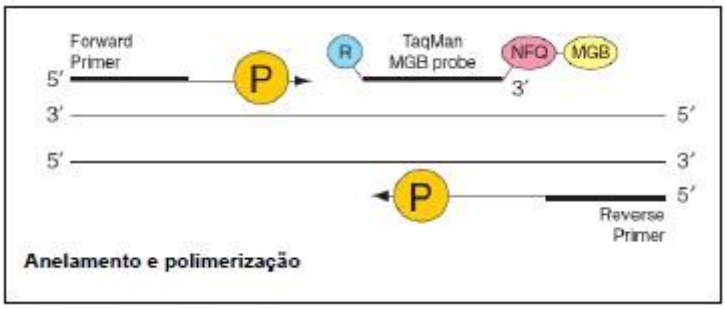
Os sistemas de detecção da PCR em Tempo Real utilizam fluoróforos que são moléculas que proporcionam o monitoramento do progresso da reação ao longo dos ciclos. Os dados são coletados ao longo da PCR, ao invés de serem apenas ao final da reação, ou seja, a amplificação de um alvo é detectada logo no primeiro momento em que ocorre, ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos (MACKAY; ARDEN; NITSCHIE, 2002; PANG et al., 2004).

Existem dois sistemas mais conhecidos, o SYBR® Green, que baseia-se na emissão de fluorescência deste reagente ao se intercalar inespecificamente à dupla fita de DNA nas fases de anelamento dos *primers* e a extensão da sequência alvo (MACKAY et al., 2002).

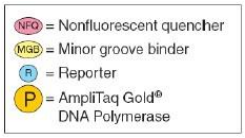
O sistema TaqMan® utiliza uma sonda fluorescente para permitir a detecção de um produto específico conforme este se acumula durante os ciclos da PCR. Uma sonda é construída contendo um corante *repórter* fluorescente na extremidade 5´ e um *quencher* (silenciador) na extremidade 3´. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante repórter através da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço (LIFE TECHNOLOGIES, 2007). Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos *primers* e é clivada através da atividade da exonuclease 5´ - 3´da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é extendido (Figura 1). Esta clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal do corante *reporter*, remove a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde. Assim, a inclusão da sonda não inibe o processo geral da PCR. As moléculas adicionais do corante *reporter* são clivadas de suas respectivas sondas em cada ciclo, resultando em um aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade de *amplicon* produzido (LIFE TECHNOLOGIES, 2007).

Sondas com MGB (*minor groove binding*) apresentam uma molécula que estabiliza a hibridização da sonda com a fita simples do DNA alvo. Fazendo isso, aumenta a especificidade e sensibilidade da hibridização aumentando a temperatura de melting e reduzindo o tamanho da sonda. A hibridização da sonda MGB com um alvo específico aumenta a distância entre o fluoróforo e o *quencher* aumentando a detecção da fluorescência. Isso promove uma maior acurácia na quantificação (YUN et al., 2012).

Figura 1- Representação de uma sonda Taqman anelando especificamente na sequência complementar situada entre as regiões de anelamento dos *primers* (LIFE TECHNOLOGIES, 2007).



Legenda:



Fonte: LIFE TECHNOLOGIES, 2007

A principal desvantagem do sistema TaqMan é a necessidade de síntese de diferentes sondas para sequências distintas. Entretanto, a hibridização específica necessária entre a sonda e o alvo para gerar sinal fluorescente, as sondas serem marcadas com corantes *reporter* distintos e distinguíveis, os quais permitem a amplificação de duas sequências distintas em um mesmo tubo de reação e a eliminação do pós-processamento da PCR, reduzindo a mão-deobra do ensaio e custos com materiais, são algumas das vantagens em usar esse sistema (LIFE TECHNOLOGIES, 2007).

Wolffs et al. (2011) observaram que a adoção de uma abordagem molecular para a detecção de patógenos virais relacionados às enterites em humanos possibilitou um aumento da detecção de 49% para 97% se comparado aos testes convencionais.

Jothikumar et al. (2009), padronizaram uma reação de PCR em sistema TaqMan® para a detecção de rotavírus em amostras clínicas humanas e ambientais. Apesar de ter sido um grande avanço no diagnóstico do agente, para o seu desenvolvimento não contemplou a variabilidade genética presente nas estirpes suínas e bovinas de rotavírus, podendo levar a resultados do tipo "falso-negativos".

Zeng et al. (2008) desenvolveram um método One-Step quantitativo RT-PCR para a detecção do rotavírus em diarreias crônicas a partir de *primers* e sonda desenvolvidos para uma região conservada, NSP3, que tem homologia com bovinos, suínos, símios e humanos do sorogrupo A das rotaviroses. Comparando com o PCR convencional, o RT-PCR apresentou

maior rapidez e sensibilidade, além de um menor risco de contaminação e menor tempo de manipulação humana.

A profilaxia das rotaviroses inclui diversas medidas de controle, principalmente no que diz respeito às medidas de caráter higiênico-sanitário. Pode-se citar a desinfecção de instalações; isolamento dos animais infectados com objetivo de reduzir a transmissão do vírus aos animais susceptíveis; criação de animais de faixas etárias uniformes; e manutenção de boa condição nutricional dos animais (ALFIERI; ALFIERI; BEUTTEM-MÜLLER, 1999).

Em mamíferos domésticos os anticorpos rotavírus-específicos presentes no colostro são importantes na proteção de neonatos, pois podem prevenir a ocorrência da doença ou reduzir a gravidade da diarreia. Por isso preconiza-se a vacinação das fêmeas gestantes com vacinas inativadas para garantir altos títulos de anticorpos nos colostros. Contudo, a variabilidade antigênica e molecular dos rotavírus representa um obstáculo para a obtenção de vacinas efetivas (ALFIERI et al., 2007).

No momento dispõe-se de vacinas disponíveis no Brasil visando a prevenção da doença em bovinos, contendo os genotipos G6 e G10, e G1, G2, G3 e G4 por recombinação de rotavirus humano/bovino (utilizadas em matrizes prenhas por meio da administração de duas doses, muito embora existam relatos de falhas de proteção vacinal, tal como relatado por Lorenzetti et al. (2011).

O desenvolvimento deste teste diagnóstico permite uma vigilância mais abrangente dos rotavírus circulantes em suínos e bovinos, sendo um ponto chave na compreensão da patogenia, epidemiologia e prevenção da doença.

3 OBJETIVOS

Considerando o impacto econômico das rotaviroses e a importância do monitoramento deste agente infeccioso, os objetivos deste projeto foram:

a) Desenvolver um método de PCR em Tempo Real para a detecção de rotavírus bovino em sistema Taqman®;

b) Avaliar o teste em amostras clínicas animais mediante comparação dos resultados frente às reações de PCR convencional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram coletadas 113 amostras fecais de bovinos, principalmente jovens (5 a 90 dias para bovinos) e com sintomas de diarreia, oriundas de criações comerciais do estado de São Paulo e de Minas Gerais (Anexo 1).

As amostras foram mantidas sob refrigeração durante a coleta e congeladas a -20°C até o momento do processamento.

4.2 ESTIRPE PADRÃO

Foi utilizada a estirpe padrão NCDV de rotavírus bovino ("Nebraska Calf DiarrheaVirus"), inoculada em monocamada de cultura de células da linhagem MA104 (Rim fetal de macaco Rhesus), mantida através de sucessivos repiques no laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia do VPS/FMVZ/USP.

Decorridas 24hs pós-inoculação, foi colhido o meio de manutenção da monocamada que apresentava efeito citopático característico, que foi submetido a três ciclos de congelamento/descongelamento e centrifugado a 5.000g durante 15 minutos a 4º C para a eliminação de resíduos celulares.

4.3 PREPARO DE AMOSTRAS FECAIS

Aproximadamente 5g de cada amostra fecal foram diluídas em água ultra-pura previamente tratada com DEPC (Invitrogen™) em proporção de 1:1 (p/v) e submetidos a centrifugação a 11.400g durante 15 minutos. E foram estocadas à -20º C.

4.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A extração do RNA total das suspensões das amostras fecais foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen™) segundo instruções do fabricante.

O RNA extraído foi homogeneizado em 20µL de água tratada com DEPC e armazenado em microtubo de polipropileno de 1,5mL a -80 ºC até a realização da RT-PCR.

4.5 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

O RNA extraído (item 4.4) das amostras foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando-se *primers* randômicos (Invitrogen® Cat. No. 48190-011), visando a síntese de cDNA, de acordo com o seguinte protocolo:

- Desnaturou-se 7µL da amostra de RNA a 95ºC por 5 minutos; em seguida, transferido para banho de gelo, permanecendo neste por mais 10 minutos. Adicionou-se o RNA à solução "RT-mix", que por sua vez é composta por 1x First Strand Buffer (Invitrogen®), 1 mM de cada dNTP, 10 mM DTT, 2µL de Random Hexamers (100 ng/µL - Invitrogen® Cat. No. 48190-011) e 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen®) para um volume final de reação de 20µL; mantidos a 37ºC por 50 minutos e 70ºC por 15 minutos. Em seguida, realizou-se a quantificação de cDNA em equipamento Nanodrop (Thermo®) a ser empregado nas reações subsequentes.

4.6 TRIAGEM DAS AMOSTRAS POR PCR CONVENCIONAL

Todas as amostras foram previamente submetidas à amplificação de um fragmento parcial do segmento codificador da proteína não-estrutural NSP5 dos rotavírus do sorogrupo A, de acordo com Salem et al. (2010), mediante uma reação de *nested*-PCR, empregando-se

os *primers* P1/P2 e posteriormente P3/P4, gerando respectivamente produtos de 317 pb e 208 pb. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agaose 1,5% (p/v) em tampão TRISborato 0,045 M; EDTA 0,001 M pH 8,0, corado em banho de brometo de editio a 0,5µg/ mL por 10 minutos, e submetidos a uma corrida em 100V por 60 minutos, sendo visualizado em luz ultra-violeta.

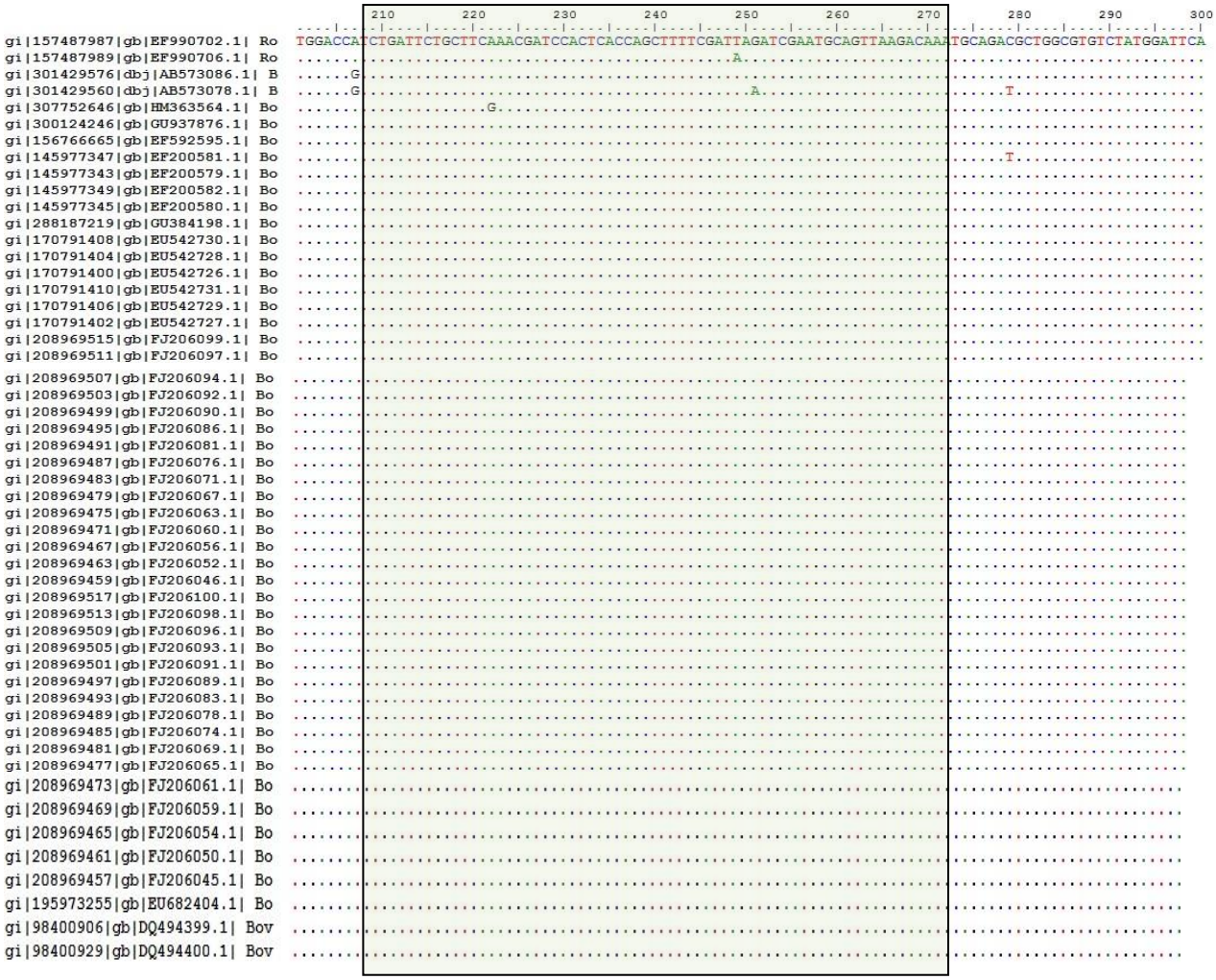
4.7 PCR EM TEMPO REAL

4.7.1 *Primer*s e sondas

Para a detecção de rotavírus por PCR em Tempo Real foram desenhados *primers* visando a amplificação do gene codificador da proteína não-estrutural NSP5. Para tanto, a partir de sequências nucleotídicas de rotavírus bovino, depositadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide), foram alinhadas mediante o uso do software Clustal W v. 1.82 (© 1994, Thompson & Gibson), seguida da edição dos fragmentos no programa Bioedit v. 7.0.9 (© 1999, Tom Hall), definição de áreas consensuais, busca de *primers* por meio de software especializado (Primer Express® Software v3.0) e estudos de possíveis inespecificidades mediante consulta à bases de dados BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) (Quadro 1, Figura 2).

A sonda para o sistema TaqMan® foi sintetizada contendo um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5´ VIC™ e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3´ MGB (Minor Groove Binding) utilizando o Software Primer Express®, com MGB (Minor Groove Binding)® (Quadro 2).

Figura 2- Alinhamento do fragmento parcial do gene codificador da proteína não estrutural NSP5 de rotavírus bovino do sorogrupo A recuperados do GenBank, sendo destacada a área utilizada para o desenho dos *primers* e sonda Taqman® desenvolvidos neste estudo.



Fonte: BERNARDES, 2013

Quadro 1- *Primers*, sequências, posição no genoma, tamanho do produto visando a amplificação parcial do gene codificador da proteína não estrutural NSP5 desenvolvidos durante o estudo.

Primer	Sequência	Posição no genoma	Comprimento do produto
Fwd NSP5-210 Rev NSP5- 275	5´-TGATTCTGCTTCAAACGATCCA-3´ 5´-GCATTTGTCTTAACTGCATTCGA-3´	210-232 253-275	65 pb

Quadro 2. Fluoróforos (Reporter e quencher), sequência e posição no genoma da sonda TaqMan® desenvolvida neste estudo, usada em conjunção com os *primers* Fwd NSP5-210 Rev NSP5-275, visando a detecção de rotavírus bovino.

Reporter	Sequência	Posição no genoma	Quencher
VIC™	5´-TCACCAGCTTTTCGATAAG -3´	233-251	MGB

4.7.2 Controle Exógeno

Em cada amostra foram adicionados 50 µL de células de rim de hamster BHK-21 (“Baby hamster kidney”) em 500 µl da suspensão fecal e processadas de acordo com o 4.4.

O controle exógeno baseou-se na detecção de β-actina desenhados baseados nas sequências de *Mus musculus* (NM_007393.5) e *Mesocricetus auratus* (NM_001281595), em sistema TaqMan®, disponível comercialmente (PrimeTime Predesigned qPCR Assay Mm.PT.56a.33257376.gs, IDT, USA), adotando-se o protocolo do fabricante, que consistiu em: adicionar o cDNA em concentração <500ng, Maxima® Probe/ROX qPCR Master Mix (Fermentas™) 1X, Primer Forward 0,3µM, Primer Reverse 0,3µM, Sonda TaqMan 150µM, água ultra-pura q.s.p. 25µL.

4.7.3 Teste dos *primers* desenhados pela PCR Convencional

A padronização da PCR convencional para o diagnóstico de rotavírus foi feita com a finalidade de se testarem previamente os *primers* utilizados na reação de PCR em Tempo Real, possibilitando a sua comparação de desempenho de detecção, utilizando-se a amostra padrão NCDV. A temperatura de hibridização dos *primers* desenhados foi definida fazendo-se uso de um termociclador de gradiente (50, 55, 60, 65 e 70º C), tomando como referência a sua *Tm* (temperatura de fusão) teórica, adotando-se o seguinte protocolo: 1X PCR Buffer (Invitrogen™); 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,5µM de cada *primer*; cDNA (item 4.6) 2,5µL; 0,625 U TaqDNA Polimerase (Invitrogen™ - 5U/µL), água ultra-pura tratada com DEPC (Invitrogen™), q.s.p. 25µL. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agaose 1,5% (p/v) em tampão TRIS-borato 0,045 M; EDTA 0,001 M pH 8,0 , corando em banho de brometo de editio a 0,5µg/ mL por 10 minutos (Figura 4).

4.7.4 Padronização da PCR em Tempo Real

Os ensaios foram desenvolvidos utilizando o sistema TaqMan® qPCR Master Mix em equipamento StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems™) visando a amplificação de um fragmento do gene codificador da proteína não-estrutural NSP5.

Adotou-se o seguinte protocolo: adicionou-se o cDNA em concentração <500 ng, Maxima® Probe/ROX qPCR Master Mix (Fermentas™) 1X, *Primer* Forward 0,3 – 0,5 µM, *Primer* Reverse 0,3 – 0,5 µM, Sonda Taqman 0,2 - 0,5µM, água ultra-pura q.s.p. 25µL.

Os tubos foram acondicionados no equipamento StepOne™ Real Time PCR System para a detecção de produtos, mediante as seguintes condições (preliminares): Desnaturação inicial de 95ºC /10 min e 40 ciclos de 95ºC /15 seg, 60ºC /20 seg, 72ºC /30seg. A aquisição dos dados foi feita durante o passo de "extensão" (72ºC).

Considerando que se trata de um “master mix”, basicamente foram testadas diferentes concentrações de *primers* e de cDNA partindo-se do valor inicial sugerido pelo fabricante, todas previamente testadas por PCR convencional. Ao final da padronização utilizando-se o padrão NCDV, as amostras de campo foram testadas por este método.

4.7.5 Quantificação absoluta

4.7.5.1 Inserção no plasmídeo, transformação bacteriana e extração plasmidial

A fim de avaliar e definir o limiar de detecção do teste, o fragmento alvo do gene codificador da NSP5 da amostra padrão de rotavírus NCDV foi clonado antes do sequenciamento do DNA.

O produto de PCR foi inserido (na região lacZ) em um vetor plasmidial pTZ57R/T (na proporção plasmídeo-inserto de 1:3) utilizando-se o kit InsTaclone™ (Fermentas, Maryland, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, e o plasmídeo foi usado para transformar células competentes da linhagem JM 109 de *Escherichia coli.*

Para tanto, 10µL de cada reação de ligação foram adicionados a 100µL de *E. coli* JM 109 competente e incubados por 30 min em gelo. A seguir, as amostras foram submetidas a um choque térmico aquecendo-se a 42º C por 2 min e imediatamente colocadas no gelo durante 2 min. As bactérias transformadas foram então cultivadas em 900µL de meio SOC por 1,5 horas à 37º C e 150 *g*. Após este período, 100µL das culturas foram plaqueadas em meio Luria–Bertani (LB) contendo 50µg/mL de ampicilina, IPTG (0,5mM) e X-Gal (40µg/ml) e incubadas a 37°C por 24 horas.

O sucesso da clonagem interrompe a sequência codificadora da β-galactosidase, codificada na região do gene lacZ do plasmídeo, sendo que aqueles que receberam o inserto de cDNA formam colônias brancas por não metabolizarem o substrato X-gal e as que não o receberam, formam colônias azuis.

Finalmente, três clones de JM109 do *amplicon* foram selecionados e submetidos à reação de PCR utilizando os *primers* M13/Puc (5’ GTAAAACGACGGCCAG 3’) senso e M13/pUC (5’ CAGGAAACAGCTATGAC 3’) antisenso direcionados para a região flanqueadora da inserção do plasmídeo seguindo as instruções do fabricante (Figura 3) para confirmação da presença do inserto. Em seguida os clones contendo os fragmentos desejados foram crescidos em meio LB contendo ampicilina (50µg/mL) durante 12 horas (*overnight*). A extração plasmidial foi realizada utilizando-se o kit NucleoSpin Plasmid™ (Macherey Nagel, Düren, Germany) como recomendado pelo protocolo do fabricante.

4.7.5.2 Sequenciamento de DNA

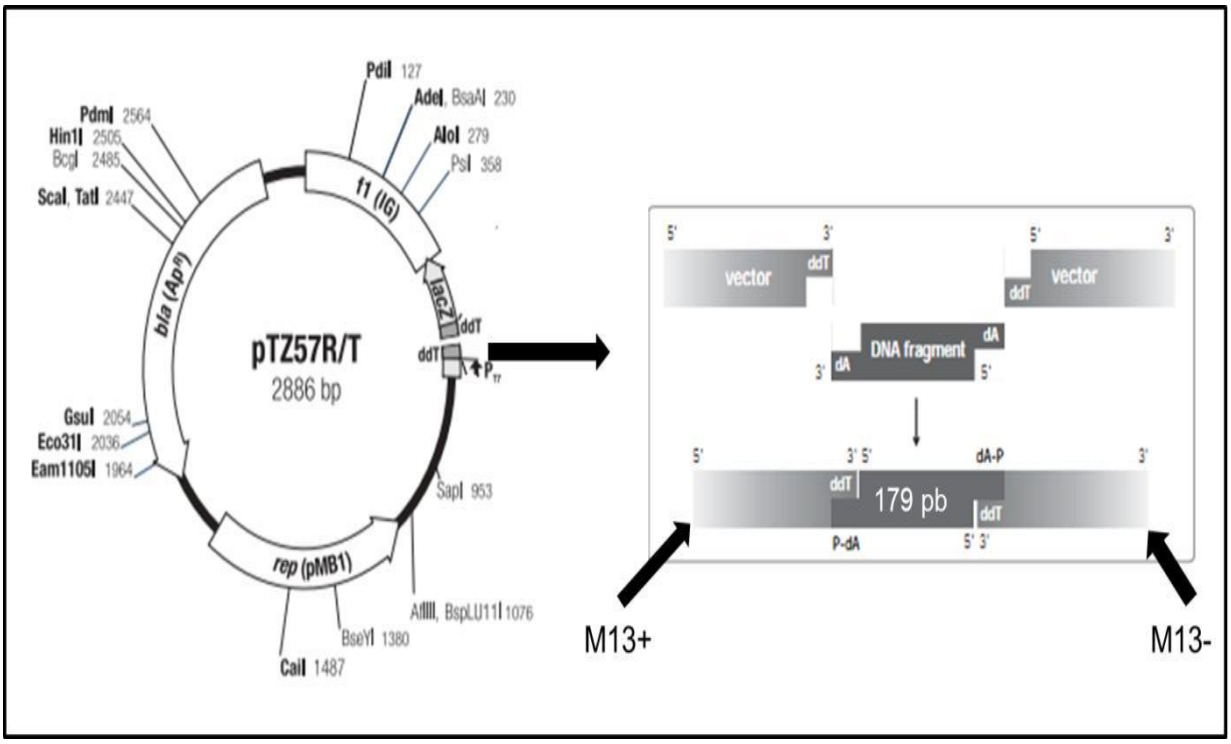
A purificação dos *amplicons* foi realizada utilizando-se *GFX PCR DNA and gel band Purification Kit* (GE Healthcare), sendo o DNA posteriormente quantificado visualmente com Low Mass DNA Ladder (Life Technologies Brasil™) segundo instruções do fabricante. A reação de seqüenciamento de DNA dos produtos purificados junto com os produtos da clonagem consistiu em 2.0µL de BigDye Terminator v3.1 (Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems™ EUA, 1.5 µL de 1x Sequencing buffer (Applied Biosystems™), 0,5M de cada *primer* (M13/pUC+ e M13/pUC-, NSP5FW+ e NSP5RV) em reações separadas, 20ng do DNA alvo. As condições da reação de sequenciamento no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf™) foram de 96ºC/1 minuto, 40 ciclos a 96ºC/15 minutos, 50ºC/15 minutos e 60ºC/4 minutos, com rampa de 1ºC por segundo entre cada temperatura.

4.7.5.3 Edição de sequencias de DNA

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências, senso e antisenso, da amostra clonada foram submetidos ao aplicativo Phred (disponível *online* em: http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/) para avaliação da qualidade dos mesmos, utilizando-se apenas posições com escore superior a 20 (probabilidade de um erro a cada 100 nucleotídeos).

A seguir, os cromatogramas foram conferidos manualmente com o programa FinchTV 1.4 (© 2006 Geospiza, Inc.) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas. A sequência final de cada amostra foi obtida com o aplicativo Cap-Contig com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida ao BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para confirmação da especificidade do sequenciamento.

Figura 3- Representação esquemática da região flanqueadora da inserção do *amplicon* de 312 pb e 504 pb dos subtipos B e A no vetor plasmidial pTZ57R/T, respectivamente.



Fonte: Thermo Fisher Scientific Inc., 2011.

4.7.5.4 Quantificação do plasmídeo

Depois de confirmada a especificidade, o plasmídeo foi quantificado através da leitura em biofotômetro Nanodrop (Thermo®), calculado conjuntamente com o seu peso molecular, definiu-se a estimativa do número de cópias, $3x10^{10}$ /µL, utilizando-se software Science Launcher (http://www.sciencelauncher.com/mwcalc.html).

4.7.5.5 Construção da curva padrão

O limite de detecção e a eficiência da reação foram determinados a partir da construção da curva-padrão com diluição seriada ($6x10^{9}$ a $6x10^{-1}$ cópias/reação) do plasmídeo

quantificado, com as mesmas condições padronizadas no item 4.7.4, e em triplicata. O limiar de detecção foi determinado como a maior diluição capaz de evidenciar o sinal da reação.

O coeficiente de correlação (r^2) e a eficiência da reação (E) foram calculados mediante o emprego da fórmula $E=10^{(-1/slope)}-1$ (DVORAK, 2006)

4.7.5.6 Teste das amostras

Foram testadas as mesmas 113 amostras para NSP5 e β-actina em reações separadas.

As amostras que não amplificaram na reação de β-actina foram descartadas da análise, pois não foram confiáveis, uma vez que o controle exógeno determina que não houve interferência na extração e transcrição-reversa, assim como presença de inibidores da reação de PCR.

O valor de Ct de β-actina foi utilizado para a normalização, possibilitando a comparação das amostras através da correção do valor de Ct de NSP5 com o fator de correção de β-actina.

O número de cópias por reação de cada amostra foi calculado comparando-se com a curva padrão e utilizando a equação da reta Y= ax + b (onde Y é o valor de Ct, a é o valor de slope e b é a intersecção de X em Y, e x é o valor exponencial da diluição 10^x).

4.8 CÁLCULO DA CONCORDÂNCIA ENTRE PCR CONVENCIONAL E PCR EM TEMPO REAL

O cálculo da concordância foi realizado mediante o emprego do teste Kappa (LANDIS; KOCH, 1977; FLEISS, 1981) a um intervalo de confiança de 95%, mediante tabulação dos resultados das reações de PCR convencional e PCR em Tempo Real.

5 RESULTADOS

5.1 TRIAGEM DAS AMOSTRAS POR PCR CONVENCIONAL

De um total de 108 amostras testadas pela PCR convencional (item 4.4) tendo como alvo um fragmento do gene NSP5, 63 delas (55,7%) foram consideradas positivas para rotavírus. Foram excluídas do teste cinco amostras, pois não amplificaram para β-actina, indicando degradação do material genético.

5.2 PCR EM TEMPO REAL

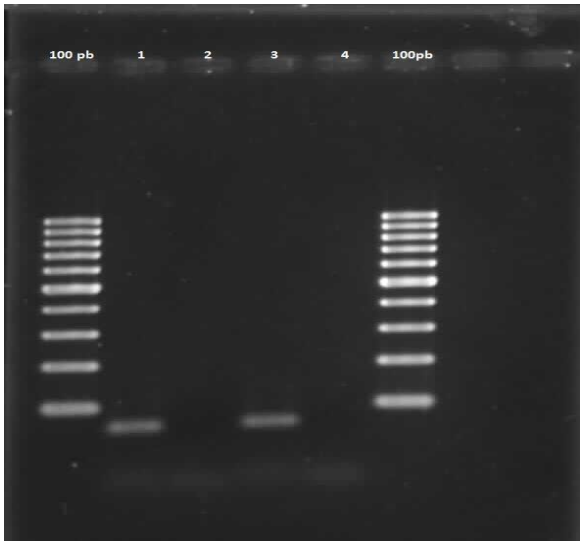
5.2.1 Teste dos *primers* desenhados para reação de PCR em Tempo Real

A estirpe padrão NCDV foi testada utilizando-se os *primers* NSP5 201 e NSP5 275, desenhados neste estudo (item 4.7.1). Observou-se a amplificação no tamanho esperado de pares de base (65pb), conforme apresentado na Figura 4, o que permitiu a continuidade da padronização da reação de PCR em Tempo Real.

5.3 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL

Após a padronização adotou-se o seguinte protocolo: cDNA em concentração <500 ng, Maxima® Probe/ROX qPCR Master Mix (Fermentas™) 1X, *Primer* Forward 0,3 µM, *Primer* Reverse 0,3 µM, Sonda Taqman® 0,2µM, água ultra-pura q.s.p. 25µL.

Figura 4- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR visando a amplificação de um fragmento de 65 pb do gene NSP5 201-275 de rotavírus bovino (1 e 3).



Fonte: (BERNARDES, 2013)
Legenda: 100pb - Marcador de peso molecular; 1 e 3 : Replicatas da amostra NCDV; 2 e 4: Controle negativo (água ultrapura)

5.4 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

Para a PCR em Tempo Real o limite de detecção foi considerado o valor de $6x10^1$ cópias/reação, sendo definido o ponto de corte o ciclo (Ct) de número 36 para o teste com a amostra viral a partir do DNA ligado em vetor plasmidial, tal como apresentado na Figura 5.

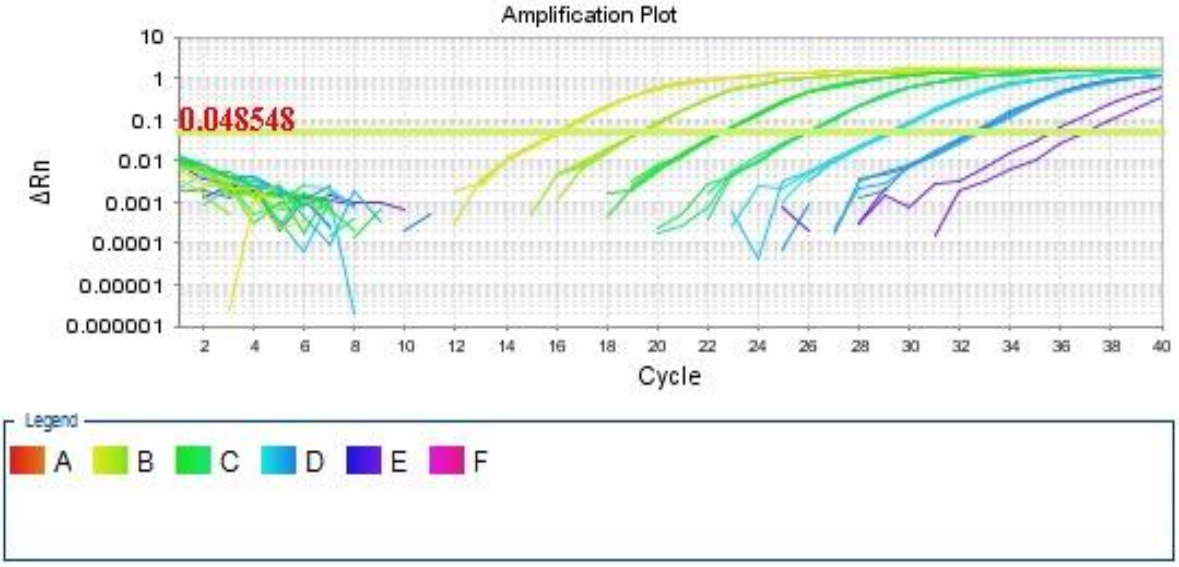
A curva padrão da PCR em tempo real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5 teve como resultados, uma eficiência de 108,5%; com *slope* igual a -3,122 e R^2 de 1,0 (Figura 5).

Das 113 amostras testadas cinco não amplificaram para β-actina e não foram incluídas nas análises posteriores (Figura 7).

Considerando-se o ponto de corte de 60 ($6x10^1$) cópias/reação, das 108 amostras testadas, 63 (58,3%) foram consideradas positivas ao teste (Figura 8) (Tabela 1).

Com a quantificação absoluta foi possível observar que as amostras possuem carga viral de $6,1x10^{10}$ a 6,1x10 cópias /reação.

Figura 5- Curvas de amplificação das diluições de amostra viral (6x 10^9 a 6x10^1) a partir do DNA ligado em vetor plasmidial, da reação de PCR em Tempo Real

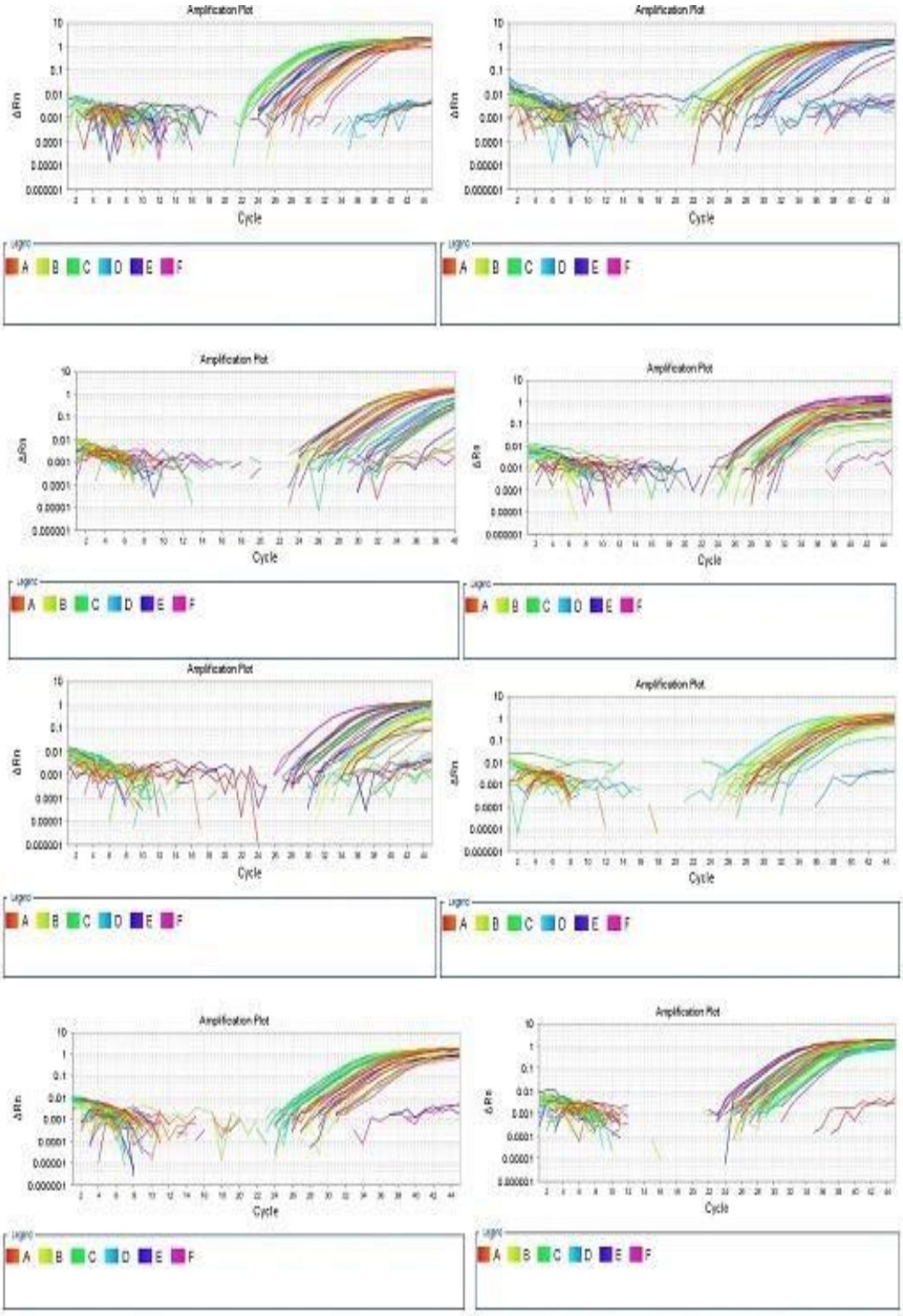


Fonte: (BERNARDES, 2013)

Figura 6. Curva padrão da PCR em sistema TaqMAn® para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5.

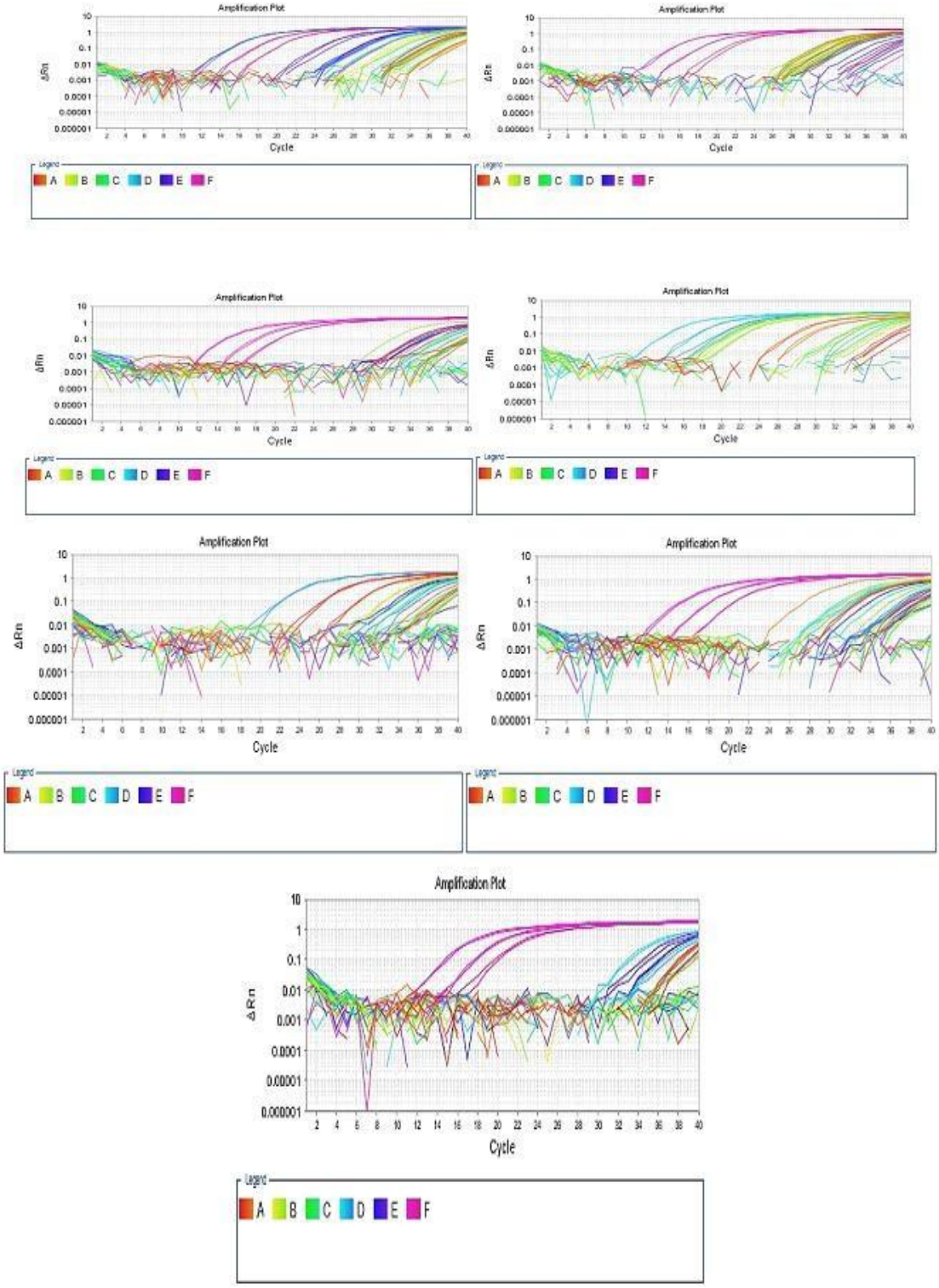
Fonte: (BERNARDES, N. T. C. G., 2013)
Legenda: Pontos: diluições 6x 10^9 a 10^1 do DNA clonado

Figura 7. Curvas de amplificação da reação de PCR em para a detecção do segmento codificador da β-actina.



Fonte: (BERNARDES, 2015)

Figura 8. Curvas de amplificação da reação de PCR em para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5.



Fonte: (BERNARDES, 2015)

Tabela 1. Resultados comparativos entre as reações de PCR em Tempo Real e PCR convencional visando o diagnóstico de rotavírus bovino do grupo A

		PCR em Tempo Real		
		Positivo	Negativo	TOTAL
PCR convencional	Positivo	34	29	63
	Negativo	11	34	45
	TOTAL	45	63	108

5.5 REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade do teste foi realizada usando qadripilicatas de cada diluição do plasmídeo em cada reação (3).

O coeficiente de variação foi baixo tanto no inter como no intra-teste (0,14 -0,53% e 0 – 0,35%) (Tabela 2).

Tabela 2. Coeficiente de variação intra e inter-teste

Número de cópias/reação	Intra-teste*			Inter-teste**		
	Ct médio	DP	CV (%)	Ct médio	DP	CV (%)
$8,6\times10^{7}$	15,99 - 16,00	0,02 - 0,08	0,14 - 0,49	16,00	0,00	0,00
$8,6\times10^{6}$	19,33 - 19,37	0,04 - 0,09	0,20 - 0,48	19,35	0,02	0,11
$8,6\times10^{5}$	22,60 - 22,67	0,02 - 0,09	0,08 - 0,38	22,63	0,03	0,14
$8,6\times10^{4}$	25,92 - 26,02	0,04 - 0,14	0,14 - 0,53	25,96	0,06	0,22
$8,6\times10^{3}$	29,26 - 29,42	0,07 - 0,13	0,24 - 0,46	29,34	0,08	0,28
$8,6\times10^{2}$	32,60 - 32,83	0,14 - 0,35	0,44 - 1,05	32,72	0,12	0,35

5.6 CÁLCULO DE CONCORDÂNCIA

O valor de concordância obtido através do teste Kappa, a um intervalo de confiança de 95%, a partir dos resultados gerados entre os testes de PCR convencional e PCR em Tempo Real foi de 0.279 (baixa concordância) (LANDIS; KOCH, 1977; FLEISS, 1981).

Tabela 3. Valores de concordância obtidos pelo teste Kappa, a um intervalo de confiança de 95%, a partir dos resultados gerados entre os testes de PCR convencional e PCR em Tempo Real

Kappa Geral	
Kappa geral	0.279
p-valor geral	0.002
Intervalo de 95% de confiança do	**sup:** 0.458 **inf:** 0.101

6 DISCUSSÃO

A diarreia neonatal é o principal problema sanitário que acomete os bezerros nas primeiras semanas de vida, causando grandes prejuízos devido à morbidade, mortalidade, custos com tratamento e atraso no desenvolvimento. O rotavírus bovino merece destaque sendo que no Brasil há uma escassez de informações disponíveis a respeito da ocorrência dessa virose nas criações de bovinos. Portanto, um diagnóstico rápido e sensível, pode ajudar no combate dessa enfermidade. O principal objetivo desse estudo foi o de desenvolver teste de PCR em Tempo Real para diagnóstico para o gene codificador NSP5 de rotavírus bovino, um gene que apresenta uma relativamente alta conservação dentre as diferentes amostras circulantes.

Os rotavírus possuem diferentes genotipos e variação intragenotípica, o que converge para o desenvolvimento de técnicas que contemplem a diversidade genética dos vírus que acometem diferentes espécies animais ou humanos. Midgley et al. (2012) encontraram, em bovinos na Europa, 10 combinações diferentes de G e P, onde os mais comuns foram G6P[11] e G6P[5].

No Japão, foram encontradas nove amostras positivas para rotavirus, das quais uma foi classificada como G10P[11], uma foi classificada como G21P[29] e as outras cinco não puderam ser classifcadas (ABE et al., 2009).

Em bovinos do Brasil, um estudo realizado por Alfieri, et al. (2009), foram encontrados pelo menos 6 genotipos diferentes, G6P[1], G5P[1], G6P[5], G6P[11], G8P[11] e G10P[11]. E encontraram também alguns genótipos que sugerem infecções associadas, G6+G8P[5], G6P[1]+P[5].

Silva et al. (2012), encontraram genotipos compatíveis de suínos e bovinos em avestruzes.

A variabilidade genética e complexidade do Rotavirus Bovino sorogrupo A são dificuldades a se superar para um controle eficiente dessa infecção. Portanto a escolha da NSP5, uma vez que esta é uma proteína altamente conservada do genoma viral, dimiui as possibilidades de falso-negativo, frente a sua função biológica nos processos de replicação viral.

A metodologia de PCR convencional utilizada para fins de comparação neste estudo, apesar de ter sido descrita para o diagnóstico de rotavírus suínos (SALEM, 2010), também visa a detecção do gene NSP5. Entretanto pode ser uma das explicações para a discrepância

entre os resultados com a PCR em tempo real aqui desenvolvida já que tratam-se de espécies diferentes.

Padronizou-se a técnica de PCR em Tempo Real, sistema Taqman®, utilizando sonda MGB, para diagnóstico de rotavírus bovino para o gene codificador NSP5, tendo sido aplicada em amostras fecais bovinas. As moléculas de MGB, estabilizam a hibridização da sonda com a fita simples do DNA-alvo, aumentanto a especificidade, sensiblidade e a temperatura de melting e reduzindo o tamanho da sonda. A hibridização da sonda MGB com um alvo específico aumenta a distância entre o fluoróforo e o *quencher*, aumentando a detecção da fluorescência, promovendo uma maior acurácia na reação (YUN et al., 2012).

Ciglenecki et al. (2008) demonstraram que o sistema TaqMan® usando sonda MGB foi mais apropriado para a detecção de pestivirus devido ao baixo risco de contaminação, pois elimina a pós-PCR, detecção apenas dos produtos específicos, bem como o tempo de reação reduzido e foi capaz de lidar com várias amostras ao mesmo tempo e promover resultados com maior sensibilidade.

Quanto à possibilidade de falso-positivo, o sistema Taqman tem um duplo mecanismo que confere uma maior especificidade dos resultados. Para se obter o sinal de reação é necessário não só a hibridização dos *primers*, mas também da sonda. Isto se torna particularmente útil em vírus que apresentem uma elevada variabilidade, como é o caso dos rotavírs, uma vez que, ao se diminuir o tamanho das sondas e *primers*, reduzem-se também as chances de não pareamento ou pareamento inespecífico, falso-negativo por hibridização insuficiente dos primers.

Zeng et al. (2008) desenvolveram um método One-Step quantitativo PCR tempo real para a detecção do rotavírus em diarreias crônicas a partir de *primers* e sonda desenvolvidos para uma região conservada, NSP3. A PCR em Tempo Real foi possível detectar uma ampla gama de vírus, de 6×10^0 a 6×10^8 cópias por reação. O coeficiente de correrlação de R^2 >0.99 indicou uma forte correlação linear.

No presente estudo a curva padrão da PCR em Tempo Real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5 teve como resultado, uma eficiência de 108,5%; e R^2 igual a 1 (figura 6), indicando também uma forte correlação linear.

Para a sensibilidade analítica foi capaz de verificar que o sistema amplificou o controle NCDV de forma lienar a de 6×10^3 até 6×10^9 a cópias de DNA/mL.

Jothikumar et al. (2009) por sua vez, demonstraram , durante a padronização de uma reação de PCR em sistema Taqman®, para a detecção de rotavírus em amostras clínicas

humanas e ambientais, que as curvas de fluorescência sigmoidais, refletindo eficiente produção de amplicons, foram obtidas para todas as amostras testadas, e os valores de Ct entre 12 e 35 ciclos.

A partir da clonagem do padrão NCDV, foi possível quantificar o plasmídeo, e assim precisar a sensiblidade da prova, na qual foi possível detectar até $6x10^3$ cópias de DNA/mL.

Tem sido demonstrado que a PCR em Tempo Real, para a detecção e quantificação de rotavírus, é mais rápida e sensível, por vários autores (MACKAY et al., 2002; KANG et al., 2004; PANG et al., 2004). Neste trabalho a reação se mostrou mais rápida também, quando comparada com a PCR convencional utilizada para triagem das amostras, durando aproximadamente 40 min.

Marconi et al., (2015) em seu estudo com SYBR Green, concluíram que as vantagens da PCR em Tempo Real sobre a convencional vão além da rapidez. Incluem também a diminuição de contaminação cruzada e alta sensibilidade para o diagnóstico de RVA em suínos.

O diagnóstico de rotavírus deve ser direto, pois, por ser um vírus ubiquitário, a sorologia não corresponde necessariamente ao diagnóstico de infecção recente. Portanto, parte-se do material fecal, que pela sua natureza, carreia consigo uma série de inibidores e contaminantes. A adoção do controle exógeno assegura que os resultados negativos são decorrentes da ausência do vírus (ou em níveis inferiores aos detectáveis pelo teste) e não de efeito inibitório do meio sobre as partículas virais.

Para evitar resultados falso-negativos através da degradação do RNA ou outros fatores inibidores, é recomendado o uso de controle exógeno em cada amostra, portanto decidiu-se pela β-actina. Com efeito no teste aqui padronizado, os controles funcionaram como esperado entre todas as amostras submetidas à PCR em Tempo Real, quer fossem negativas ou positivas para rotavírus.

Obtivemos uma concordância baixa entre PCR convencional e PCR em Tempo Real. Uma das explicações reside nas diferenças de limiar de detecção destes dois métodos. Nesta obtivemos limiar suficiente para detectar pelo menos $6X10^1$ cópias/reação enquanto que a da PCR convencional foi de $10^1 TCID_{50}$/mL (SALEM et al., 2010).

A disparidade entre os resultados de PCR convencional e em Tempo Real onde 11 amostras foram positivas para o primer do Salem et al. (2010) e negativas na PCR em Tempo Real, pode ser explicado pela perda de material, onde ao fazer uma segunda extração, algumas amostras dispunham de pouco material fecal, interferindo na integridade das partículas virais.

As diarreias geralmente envolvem a participação de diferentes agentes (bacterianos, virais e parasitários), por isso optamos pela transcrição reversa com *radom primers*, pois traz consigo a vantagem do RNA extraído e transcrito, poder ser empregado para a detecção de outros agentes (coronavírus, astrovirus, calicivirus) ou mesmo para os demais genes dos rotavírus conferindo flexibilidade e diminuição de custos.

Diante de um cenário de grande importância do agronegócio brasileiro, através dos resultados obtidos nesse estudo, espera-se contribuir para que a PCR em Tempo Real possa ser utilizada no diagnostico rápido e eficiente do rotavírus do grupo A em amostras de fezes, proporcionando maior sensibilidade para o diagnóstico clínico, aumentando o repertório dos testes já estabelecidos.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir:

a) O método desenvolvido em sistema Taqman® para a detecção de rotavirus bovino foi capaz de detectar até 60 cópias de DNA alvo/reação, demonstrando alta sensibilidade;

b) A avaliação do teste em amostras clínicas animais mediante comparação dos resultados frente às reações de PCR convencional teve baixa concordância.

REFERÊNCIAS

ARNOLDI, F.; CAMPAGNA, M.; EICHWALD, C.; DESSELBERGER, U.; BURRONE, O. R. Interaction of rotavirus polymerase VP1 with Nonstructural Protein NSP5 is stronger than that with NSP2. **Journal of Virology,** v. 81, n. 5, p. 2128-2137, 2007.

BAR-MAGEN, T.; SPENCER, E.; PATTON, J. T. An ATPase activity associated with the rotavirus phosphoprotein NSP5. **Virology**, v. 369, p. 389-399, 2007.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. **Lancet,** v.2, p. 1281, 1973.

BOK, K.; PALACIOS, G.; SIJVARGER, K.; MATSON, D.; GOMEZ, J. Emergence of G9 P[6] human rotaviruses in Argentina: phylogenetic relationships among G9 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4020-4025, 2001.

BRANDÃO, P. E.;CORTEZ, A. FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GREGORI, F.; HEINEMANN, M. B.; HOMEM, V. S. F.; RODRIGUEZ, C. A. R.; JEREZ, J. A. **A** soroprevalência de anticorpos anti-rotavirus do soro grupo A em bovinos de uma fronteira pioneira na Amazônia Brasileira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** v.39, n.1, p. 18-20, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de legislação. Programas nacionais de saúde animal do Brasil, 2009. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual%20de%20Legisla%C3%A7%C3%A3o%20-%20Sa%C3%BAde%20Animal%20-%20low.pdf. Acesso em : 12 de março de 2009.

BRITO, W. M. E. D. **Caracterização sorológica e molecular de amostras de rotavírus bovino do Estado de Goiás.** São Paulo, 1998. 211 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

CAMPAGNA, M.; BUDINI, M.; ARNOLDI, F.; DESSELBERGER, U.; ALLENDE, J.E.; BURRONE, O. R. Impaired hyperphosphorylation of rotavirus NSP5 in cells depleted of casein kinase 1a is associated with the formation of viroplasms with altered morphology and a moderate decrease in virus replication. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 2800-2810, 2007.

CAMPAGNA, M.; BURRONE, O. R. Fusion of tags induces spurious phosphorylation of rotavirus NSP5. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 8284-8285, 2006.

CIGLENECKA,U. J.; GROMA, J.; TOPLAKA, I.; JEMERSIC, L.; BARLIC-MAGANJA, D. Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: Comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes**.** **Journal of Virological Methods**, v. 147, p. 257–264, 2008.

CHO, Y.; KIM, W.; LIU, S.; KINYON, M.; YOON,K. Development of a panel of multiplex real-time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of major agents causing calf diarrhea in feces. **Journal Veterinarian Diagnosgtics Investigation**, v.22, p. 509-517, 2010.

CHUN, Y. H.; JEONG, Y. J.; PARK, S. I.; HOSMILLO, M.; SHIN, D. J.; KWON, H. J.; KANG, S. Y.; WOO, S. K.; KANG, M. I.; PARK, S. J.; CHO, K. O. Development of Onestep Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays for Rapid Detection of Porcine Group C Rotaviruses. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 74-77, 2010.

COOK, N.; BRIDGER, J.; KENDALL, K.; GOMARA, M.I.; EL-ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potential of rotavirus. **Journal of Infection**, v. 48, p. 289-302, 2004.

DEWEY, C.; CARMAN, S.; PASMA, T.; JOSEPHSON, G.; MCEWEN, B. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, v. 44, n. 8, p. 649-653, 2003.

EICHWALD, C.; RODRIGUEZ, J. F.; BURRONE, O. R. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 625-634, 2004.

ESTES, M.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: Fields virology, 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p.1918-1976.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). **The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005, p. 947-955.

FLEISS Joseph L. *Statistical methods for rates and proportions.* New York: John Wiley, 1981. p 212-236.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H.; WOODE, G.N.; BRIDGER, J.C.; DERRICK, J.M. Realtion between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet, v.2, p. 61-63, 1974.**

GOUVEA, V.; BRANDTLY, M. Is rotavirus a population of reassortants? **Trends on Microbiology**, v. 3, p. 159-162, 1995.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1338-1340, 1994a.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR**. Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1333-1337, 1994b.

GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; ROSALES, C. A. R.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L.; JEREZ, J. A. Desenvolvimento de um método de ELISA para a

detecção de rotavírus a partir de material fecal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 191-194, 2000.

HERRING, A. J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.

JAIN, V.; DAS, B. K.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3524-3529, 2001.

JEREZ, J. A. Diarréias virais dos bezerros: rotavírus e coronavírus. **Biológico,** v. 59, n. 2, p. 33-37, 1997.

JOTHIKUMAR, N.; KANG, G.; HILL, V.R. Broadly reactive TaqMan assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples. **Journal of Virological Methods**, v. 155, n. 2 p. 126-31, 2009.

KANG, G.; ITURRIZA-GOMARA, M.; WHEELER, J.G.; CRYSTAL, P.; MONICA, B.; RAMANI, S.; PRIMROSE, B.; MOSES, P.D.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, D.W.; GRAY, J. Quantitationof group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction:correlation with clinical severity in children in South India. **Journal of Medical Virology**, v. 73, p. 118–122, 2004.

KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; PEERAKOME, S.; CHAN-IT, W.; YAGYU, F.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. **Virology**, v. 361, n. 2, p. 243-252, 2007.

KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Foordborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology**, n. 90, p. 23-41, 2004.

LANDIS, J. R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics,** v. 33, p. 159-174, 1977.

LUCCHELLI, A.; LANCE, S. E.; BARTLETT, P.B. et al. Prevalence of bovine group A bovine rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 169-179, 1992.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHE, A. Real-time PCR in Virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 2, p. 1292-1305, 2002.

MANCUSO, P. C. Titulagens: Kärber ou Reed-Muench? **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 2, p. 59-71, 1974.

MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BASELGA, R.; ARISTA, S.; ELIA, G.; LORUSSO, E.;

BÁNYAI, K., TERIO, V., MADIO, A., RUGGERI, F.M.; FALCONE, E.; CAMERO, M.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. **Virology**, v. 20, n. 337, p. 111-123, 2005.

GREGORI, F.; BRANDÃO, P.E.; JEREZ, J. A. Intragenotypic diversity of porcine rotavirus straisns circulating in São Paulo State, Brazil. **ARS Veterinaria,** v. 29, n. 9, p.707-7012, 2009.

MARTIN, S. W.; MEEK, A. H.; WILLBERG, P. **Veterinary epidemiology**. Iowa: The Iowa State University Press, 1987, 343 p.

MATTHEWS, R. E. F. The classification and nomenclature of viruses. **Intervirology,** v.11, p. 133-135, 1979.

MATTHINJNSSENS, J.; OTTO, P. H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE,R. VP6-sequence-based cutoff values asa criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of virology,** v.157, n. 6, p. 1177-1182, 2012.

MATTHIJNSSENS, J;. CIARLET, M.;MCDONALSD, S. M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; BRISTER, J. R;/ BUESA, J.; ESONA, M.D.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J. R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELA, V.; MERTENS, P. P. C.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F. M.; SAIF, L. J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J. T.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. uniforming of rotavirus strain nomenclature proposed by Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives or Virology,** v. 156, n. 8, p. 1397- 2011.

MATTHIJNSSENS,J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, MK.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMORA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.C.; NAKAGOMI, O;/ PATTON, J. T;/ RUGGERI, F. M.; SAIF, L. J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; RANST, M.V. Recommendations for the classification of groupa A rotaviruses using all 11 genomic RNA segements. **Virology Division News,** v.153, p. 1621-1629, 2008.

MEBUS, C.; UNDERDAHL, N. R.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. **Nebraska Research Bulletin**, Lincoln, v.233, p.1-16, 1969

MÉDICI, K. C. **Rotavírus grupos A, B e C em leitões lactentes: Frequência de diagnóstico e avaliação molecular de rotavírus atípicos.** 2007. 125 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

MIHALOV-KOVÁCS, E,. GELLÉRT, A.; MARTON, S.; FARKAS, S. L.; FEHÉR, E.; OLDAL, M.; JAKAB, F.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. **Emerging infectious Diseases,** v.21, n. 4, 2015.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Rotaviral Gastroenteritis. In: **_____Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Chlamydioses, rickettsioses and viroses.** 3 ed. Washington: PAHO, 2001, p. 286-294.

PALHARES, J. C. P. Biodigestores, a solução? **Suinocultura**, n. 7, 2007.

PANG, X. L.; LEE, B.; BOROUMAND, N.; LEBLANC, B.; PREIKSAITIS, J. K.; YU IP, C. C. Increased detection of rotavirus using a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in stool specimens from children with diarrhea. **Journal of Medical Virology**, v. 72, p. 496–501, 2004.

PARASHAR, U. D.; GIBSON, C. J.; BRESEE, J.S.; GLASS, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhoea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 304-306, 2006.

PARRA, G. I.; BOK, K.; MARTÍNEZ, M.; GOMEZ, J. A. Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 6, p. 1713-1716, 2004.

PARRA, G. I.; VIDALES, G.; GOMEZ, J. A.; FERNANDEZ, F. M.; PARREÑO, V.; BOK, K. Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1-3, p. 243250, 2008.

REED, L. J.; MUERNCH, H. A Simples method of estimating fifty per cent end-points**.** **American Journal of Hygiene**, v. 56, p. 493-497, 1938.

RODRIGUEZ, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; FERREIRA, F.; BUZINARO, M. G.; JEREZ, J. A. Improved Animal Rotavirus Isolation in MA-104 cells using different trypsine concentrations. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 437-441, 2004.

SALEM, A. N. B., SERGEI, A. C., OLGA, P. B., OLGA, G. A., MAHJOUB, A.; LARISSA, B.P. Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 165, p. 283–29,2010.

SAMANIEGO-HERNÁNDEZ, M.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; APARICIO-FABRE, R.; ARIAS-ORTIZ, C.; BARBA DE LA ROSA, A. P. Expression and purification of rotavirus proteins NSP5 and NSP6 in *Escherichia coli.* **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 44, p. 336-341, 2006.

SEN, A.; AGRESTI, D.; MACKOW E. R. Hyperphosphorylation of the rotavirus NSP5 protein is independent of serine 67 or NSP2, and the intrinsic insolubility of NSP5 is regulated by cellular phosphatases. **Journal of Virology**, v. 80, p. 1807-1816, 2006.

SEN, A.; SEN, N.; MACKOW, E. R. The formation of viroplasm-like structures by the rotavirus NSP5 protein is calcium regulated and directed by a c-terminal helical domain. **Journal of Virology**, v. 81, n. 21, p. 11758-11767, 2007.

SILVA, R. R.; BARROS D. M.; SOUZA, R. K. A. et al. Pesquisa de rotavírus em bezerros bovinos no município de Igarapé-açu (PA). **Revista de Ciências Agrárias**, n. 36, p. 121129, 2001.

SOTELO, P. H.; SCHÜMANN, M.; KRAUSE, E.; CHNAIDERMAN, J. Analysis of rotavirus non-structural protein NSP5 by mass spectrometry reveals a complex phosphorylation pattern. **Virus Research**, v. 149, p. 104-108, 2010.

STEYER, A.; POLJSAK-PRIJATELJ, M.; BARLIC-MAGANJA, D.; JAMNIKAR, U.; MIJOVSKI, J. Z.; MARIN, J. Molecular characterization of a new porcine rotavirus P genotype found in an asymptomatic pig in Slovenia. **Virology**, v. 359, n. 2, p. 275-282, 2007.

STEYER A.; POLJSAK-PRIJATELJ M.; BARLIC-MAGANJA D.; MARIN J. 2008. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: Evidence of interspecies transmission and genome reassortment. **Journal of General Virology,** v. 89, pt. 7, p. 1690-1698, 2008.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, S. Diversity in rotavirus genomes. **Seminars in Virology**, v. 6, p. 123-131, 1995.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater.** 3. ed. Genebra: World Health Organization, 2006.

WOLFFS, P. F.; BRUGGEMAN, C. A.; VAN WELL, G.T.; VAN LOO, I. H. Replacing traditional diagnostics of fecal viral pathogens by a comprehensive panel of Real-Time PCRs. **Journal Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1926-1931, 2011.

YUN, T.; NI, Z.; HUA, J.; YE, W.; CHEN, L.; ZHANG, S.,; ZHANG, Y.; ZHANG, C. Development of a one-step real-time RT-PCR assay using a minor-groove binding probe for the detection of duck Tembusu virus. **Journal of Virological Methods**, v.161, p. 148-154, 2012.

ZENG, S. Q.; HALKOSALO, A.; SALMINEN, M.; SZAKAL, E. D.; PUUSTINEN, L.; VESIKARI, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal Virological Methods**, v. 153, n. 2, p. 238-240, 2008.

ANEXO

Amostras	Origem	Tipo	Real Time	Salem
1	Lavras - MG	Corte	POSITIVO	POSITIVO
2	Lavras - MG	Leiteira	NEGATIVO	POSITIVO
3	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
4	Lavras - MG	Leiteira	NEGATIVO	POSITIVO
5	Lavras - MG	Leiteira	NEGATIVO	POSITIVO
6	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
7	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
8	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
9	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
10	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
11	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
12	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
13	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
14	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
15	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
16	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
17	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
18	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
19	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
20	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
21	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
22	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
23	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
24	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
25	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
26	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
27	Lavras - MG	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
28	Mogi Mirim -SP	Corte	POSITIVO	NEGATIVO
29	Mogi Mirim -SP	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO
30	Mogi Mirim -SP	Corte	POSITIVO	POSITIVO
31	Mogi Mirim -SP	Corte	NEGATIVO	POSITIVO
32	Mogi Mirim -SP	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO
33	Mogi Mirim -SP	Corte	POSITIVO	POSITIVO
34	Mogi Mirim -SP	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO
35	Mogi Mirim -SP	Corte	POSITIVO	POSITIVO
36	Mogi Mirim -SP	Corte	POSITIVO	POSITIVO
37	Lavras - MG	Corte	NEGATIVO	POSITIVO
38	Caçapava - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
39	Cachoeira Paulista -SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
40	Cachoeira Paulista -SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
41	Caçapava - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
42	Caçapava - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
43	Bragança Paulista -SP	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO
44	Bragança Paulista -SP	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO
45	Bragança Paulista -SP	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO

46	Bragança Paulista -SP	Corte	NEGATIVO	POSITIVO
47	Bragança Paulista -SP	Corte	NEGATIVO	POSITIVO
48	Prata - MG	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO
49	Prata - MG	Corte	POSITIVO	POSITIVO
50	Prata - MG	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO
51	Prata - MG	Corte	POSITIVO	POSITIVO
52	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
53	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
54	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
55	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
56	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	negativo
57	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
58	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
59	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
60	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
61	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
62	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
63	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
64	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
65	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
66	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
67	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
68	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
69	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
70	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
71	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
72	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
73	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
74	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	POSITIVO
75	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
76	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
77	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
78	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
79	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
80	Mogi Mirim -SP	Corte	POSITIVO	POSITIVO
81	Mogi Mirim -SP	Corte	POSITIVO	POSITIVO
82	Mogi Mirim -SP	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO
83	Mogi Mirim -SP	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO
84	Mogi Mirim -SP	Corte	NEGATIVO	NEGATIVO
85	Mogi Mirim -SP	Corte	POSITIVO	NEGATIVO
86	Mogi Mirim -SP	Corte	POSITIVO	POSITIVO
87	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
88	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
89	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
90	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
91	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
92	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
93	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
94	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
95	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
96	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	POSITIVO
97	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	POSITIVO

98	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
99	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	NEGATIVO
100	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
101	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	POSITIVO
102	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
103	Lavras - MG	Corte	POSITIVO	NEGATIVO
104	Lavras - MG	Corte	POSITIVO	NEGATIVO
105	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
106	Descalvado - SP	Leiteira	POSITIVO	NEGATIVO
107	Descalvado - SP	Leiteira	NEGATIVO	POSITIVO
108	Mogi Mirim -SP	Corte	POSITIVO	POSITIVO